

Chapitre II

Protocoles expérimentaux

Ce chapitre est dédié d'une part à la présentation de la purification et de la préparation de la protéine pour les différents expériences, et d'autre part, à la description des conditions expérimentales et du traitements des données des expériences que nous avons faites pour caractériser l'état natif et les états dénaturés de la protéine. Les résultats correspondants sont présentés dans les chapitres III et IV.

2.1 Préparation des échantillons de néocarzinostatine

La néocarzinostatine a été obtenue au laboratoire par expression dans *Escherichia coli* et purifiée selon la méthode décrite par Heyd et al [Heyd, 1999].

2.1.1 Expression de la protéine

Un vecteur d'expression a été obtenu à partir du plasmide pET 12a (plasmid for expression by T7 RNA polymerase) qui contient le gène synthétique de la néocarzinostatine, un promoteur de la T7 RNA polymerase et une préséquence permettant la sécrétion de la protéine dans l'espace périplasmique. Le plasmide contenant le gène de la NCS est appelé pNCS.sec. L'expression du gène de la NCS a été effectuée dans une souche d'*Escherichia Coli* (BLR 21(De3)pLysS).

Des cellules compétentes ont été transformées par le plasmide pNCS.sec selon un protocole classique et cultivées sur des boîtes contenant du milieu 2xYT (extrait de levure). Après incubation à 37°C pendant une nuit, ces cellules peuvent être conservées à la température de 4°C sur milieu solide pendant environ deux mois.

Une colonie de bactéries fraîchement transformées a ensuite été prélevée et transférée dans 1 L de milieu 2xYT, contenant 100 mg/l d'ampicilline, de chloramphénicol et tétracycline qui permettent aux seules bactéries transformées de se multiplier. La culture se fait sous agitation pendant trois jours, à la température de 37°C.

Avec ce protocole, la protéine est sécrétée dans le milieu de culture à des concentrations relativement hautes. Il est possible de produire de 200 à 300 mg de protéine par litre de milieu de culture. La protéine recombinante est correctement repliée et fonctionnelle.

2.1.2 Purification de la protéine.

Après les trois jours de culture, les bactéries sont centrifugées pendant 20 minutes à la vitesse de 7500 rpm. Le surnageant est précipité au sulfate d'ammonium à raison de 650 g/l.

Le milieu est alors centrifugé et le culot récupéré est redissout dans un minimum de tampon acétate 20 mM, pH 5.

Le milieu contenant la protéine est dessalé par dialyse contre de l'eau distillée pendant deux heures, puis contre du tampon acétate 20 mM, pH 5 pendant une nuit. La première dialyse a pour but d'éviter la formation d'agrégats et donc des pertes de protéine. Les éventuels agrégats sont éliminés par centrifugation puis la solution est concentrée et déposée sur une colonne d'échange d'ions (Q Sepharose) préalablement équilibrée avec du tampon acétate. Le passage sur cette colonne permet de débarrasser la solution de toutes les molécules qui n'ont pas d'affinité pour le gel (la protéine, préparée à pH 5, est chargée négativement). La colonne est ensuite rincée avec du tampon acétate 20mM jusqu'à l'obtention d'une absorbance nulle. Les protéines fixées sont finalement éluées par passage de tampon acétate à 0.5M, pH 5. La solution récupérée est concentrée à nouveau et passée à travers une colonne d'exclusion (Sephadex G50) préalablement équilibrée avec du tampon phosphate de 60mM, pH 7. Les fractions collectées sont contrôlées par absorbance. Toutes les fractions correspondant au premier pic d'éluion, le plus intense, sont récupérées.

La NCS ainsi purifiée peut être conservée au réfrigérateur sous forme précipitée dans une solution saturée de sulfate d'ammonium.

2.1.3 Electrophorèse en condition dénaturante

Toutes les étapes de la purification ont été contrôlées par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

Des échantillons de 10 à 200 µg de protéine sont d'abord dénaturés par chauffage au bain marie bouillant pendant 3 mn dans du tampon Tris-HCl 60mM, pH 6.8 contenant 10% (v/v) de glycérol, 3% (m/v) de SDS, 4-5% (v/v) de β-mercaptoéthanol. Après addition de bleu de bromophénol, ces échantillons sont déposés à la surface d'un gel constitué de 4% (m/v) d'acrylamide, de 0.1 % (m/v) de bisacrylamide et de 0.1% (m/v) de SDS, en tampon Tris-HCl 0.1 M, pH 6.8. Le gel de migration inférieur a une composition différente. Il est constitué de 12% d'acrylamide, de 0.3% (m/v) de bisacrylamide et de 0.1% (m/v) SDS en tampon tris-HCl 0.4 M, pH 8.8.

L'électrophorèse est réalisée à la température ambiante avec un tampon Tris-HCl 25mM, pH 8.3 contenant 0.2 M de glycine et 0.1% (m/v) de SDS, pendant 2 heures sous une intensité de 20 mA et une tension de 120 V. Le gel est coloré au bleu de coomassie (0.13% dans du TCA à 50%), puis décoloré par un mélange aqueux contenant 5%(v/v) de méthanol et 7.5% (v/v) d'acide acétique.

La Fig 2. 1 montre le résultat d'électrophorèses réalisées sur les échantillons collectés pendant les diverses étapes de la purification.

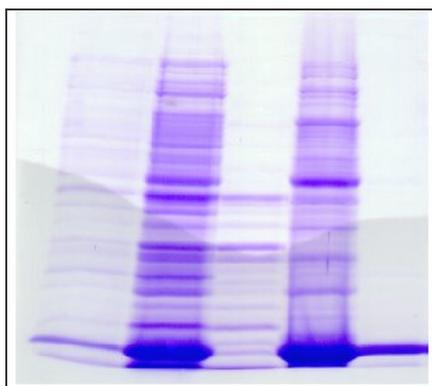


Fig 2. 1 Gel d'électrophorèse.

2.1.4 Mesure de la concentration de la NCS

Une détermination précise, en valeur absolue, de la concentration de protéine est indispensable tant pour l'estimation des paramètres thermodynamiques que pour l'interprétation des spectres de diffusion des neutrons ou des rayons X. La concentration de NCS a été mesurée par spectrophotométrie U.V. Le coefficient d'extinction molaire, est donné dans la littérature : $\epsilon = 1.2 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 280nm.

2.1.5 Préparation des échantillons pour les expériences

La préparation des échantillons a constitué une partie importante de la réalisation de certaines expériences. Les procédures diffèrent quelque peu selon que la protéine est préparée dans l'eau légère ou dans l'eau lourde.

Préparation dans l'eau légère

La préparation commence par une dialyse fractionnée de la solution de protéine contre un tampon phosphate 60 mM. Cette étape est très importante, parce que le tampon est souvent

utilisé comme référence. Après dialyse, la protéine est centrifugée afin d'éliminer d'éventuels agrégats. Dans le cas particulier des expériences de diffusion de la lumière, les échantillons ont été préalablement filtrés avec des filtres en Teflon de 0,22 µm de porosité pour éliminer les poussières toujours présentes dans les solutions.

Lorsque la protéine doit être dénaturée par chauffage, la solution et le tampon sont préalablement dégazés pour éviter l'apparition de bulles lorsque la température augmente. Lorsque la dénaturation doit être provoquée par du GdnHCl, une solution mère de ce dernier est d'abord préparée à une concentration proche de la saturation ($\cong 8$ M). La concentration exacte de GdnHCl est obtenue par mesure de l'indice de réfraction de la solution, la conversion étant effectuée à l'aide de la relation de Nozaky [Nozaky 1970] :

$$[\text{GdnHCl}] = 57,141 \Delta n + 38,68 (\Delta n)^2 - 91,6 (\Delta n)^3 \quad (2. 1)$$

où Δn est la différence d'indice de réfraction entre la solution et le tampon 0M.

Les échantillons nécessaires aux diverses expériences ont été réalisés par dilution de la solution mère de NCS avec le tampon de dialyse et, éventuellement, la solution de GdnHCl. Les échantillons dénaturés chimiquement ont été préparés 24 heures à l'avance afin qu'ils aient atteint l'équilibre avant le début de l'expérience. Leurs concentrations en dénaturant ont été vérifiées par mesure de l'indice de réfraction.

Préparation dans l'eau lourde

Les expériences de DNPA requièrent que la protéine soit préparée dans un tampon d'eau lourde afin de minimiser la diffusion incohérente due aux atomes d'hydrogène. Pour obtenir le meilleur échange hydrogène-deutérium possible, la protéine est d'abord dessalée dans du tampon phosphate 60 mM deutérié à l'aide d'une colonne Sephadex G25. L'éluat est ensuite dialysé contre ce tampon pendant au moins 24 heures afin d'assurer un échange H-D à peu près complet. Comme les concentrations de protéine utilisées pendant les expériences de DNPA étaient comprises entre 5 et 20 mg cm⁻³ nous avons préparé, par ultrafiltration sur filtres Amicon, des solutions mère de NCS dont les concentrations pouvaient atteindre 60 mg cm⁻³. La deutération du GdnHCl a été faite selon le protocole décrit par Calmettes (1994). Le chlorure de guanidinium est d'abord dissout dans l'eau lourde puis placé sous une cloche à vide jusqu'à évaporation complète du liquide. Cette opération est répétée 5 fois afin que la teneur résiduelle en hydrogène soit voisine de celle de l'eau lourde utilisée ($\cong 99.8\%$ D). La concentration de la solution mère de GdnHCl a été mesurée comme expliqué précédemment.

Les échantillons utilisés pour les mesures de DNPA ont été obtenus par dilution en utilisant des pipettes automatiques ayant une précision meilleure que 1%. Les rapports de ces dilutions ont été contrôlés par pesée. Pour des raisons de commodité, la préparation des diverses solutions n'a pas été réalisée sous atmosphère anhydre. Bien que de nombreuses précautions aient été prises, la contamination des solutions de protéine et des tampons peut être estimée être inférieure à 1%.

2.2 Méthodes expérimentales

Comme la diffusion de neutrons requiert de travailler avec une solution de D₂O, et que les expériences de diffusion aux rayons X ont été faites avec une solution de H₂O, nous avons caractérisé le dépliement de la NCS dans ces deux milieux. Il ne s'agit pas d'étudier en détail les interactions protéine-solvant mais simplement de comparer les résultats entre eux.

La Table 2.1 résume, pour chaque technique employée, les conditions dans lesquelles la NCS a été étudiée. Des informations plus détaillées concernant ces expériences sont données dans ce qui suit.

Tableau 2.1. *Résumé des conditions expérimentales utilisées avec les différentes techniques.*

Spectroscopie	H ₂ O	D ₂ O	Température	PH	[GdnHCl]
Fluorescence	×	×	20°C - 80°C	7	0 M - 5 M
CD	×	×	20°C - 80°C	7	0 M - 6 M
DNPA		×	15°C	7	0 M - 6 M
DXPA	×		20°C - 80°C	7	0 M
Calorimétrie	×	×	20°C - 90°C	5 - 7	5 M
Lumière	×		15°C	5 - 7	0 M

2.2.1 Fluorescence

Nous avons utilisé un fluorimètre SLM 8000C Amico. Le trajet optique dans l'échantillon était de 1 mm et la longueur d'onde d'excitation était de 295 nm. Les spectres

d'émission ont été enregistrés à des longueurs d'onde comprises entre 300 nm et 400 nm, avec un incrément de 0.2 nm et un temps d'intégration de 0.2 s.

Les échantillons ont été préparés à la concentration de 10 μ M dans un tampon phosphate 60 mM contenant soit de l'eau légère (H_2O) soit de l'eau lourde (D_2O).

Les mesures en température ont été faites entre 20°C et 80°C. Pour éviter les erreurs systématiques, la température a été mesurée à l'aide d'une sonde introduite dans la cuve contenant l'échantillon. La dénaturation chimique induite par du GdnHCl a été suivie à des concentrations comprises entre 0 M et 6 M, les échantillons étant maintenus à 12°C.

Dans chaque cas, la fluorescence de la solution de protéine et du tampon seul a été mesurée afin de corriger, par soustraction, les spectres de la solution de la diffusion Raman du solvant. Les courbes de transitions ont été établies en représentant la variation de la longueur d'onde d'émission maximale en fonction du paramètre de dénaturation, c'est-à-dire de la température ou de la concentration de dénaturant.

L'expérience de fluorescence avec l'ANS a été faite seulement dans l'eau légère en utilisant une concentration environ dix fois plus grande que celle de la protéine en solution c'est à dire de 10mM. La molécule a été excitée à la longueur d'onde de 350nm et les spectres d'émission, ont été enregistrés entre 450nm et 550 nm en fonction de la concentration du chlorure de guanidinium comprise entre 0M et 6M,

2.2.2 Dichroïsme circulaire

Les mesures de dichroïsme circulaire (CD) dans l'ultraviolet (UV) lointain ont été réalisées à l'aide d'un dichrographe Jobin Yvon Mark V. Le trajet optique dans l'échantillon était de 0.2 mm. Les spectres de la protéine native et de la protéine dénaturée par la chaleur ont été enregistrés à des longueurs d'onde comprises entre 190 nm et 240 nm. Par contre, les spectres des échantillons dénaturés chimiquement n'ont été mesurés qu'entre 210 nm et 260 nm à cause de la forte absorption du chlorure de guanidinium entre 190 nm et 200 nm. Ces spectres ont été obtenus en utilisant un incrément de longueur d'onde de 0.5 nm et un temps

d'intégration de 0.8 s. Toutes les mesures ont été répétées plusieurs fois et moyennées et ont été faites dans les mêmes conditions que celles de fluorescence mais à une concentration de 30 μM de protéine. Les spectres ont été corrigés du bruit de fond par soustraction de la contribution du tampon. Les courbes de transition ont été établies en traçant la variation d'intensité enregistrée à 220 nm en fonction de la température ou de la concentration de GdnHCl.

2.2.3 Calorimétrie

2.2.3.1 Appareillage

Nous avons utilisé un microcalorimètre différentiel, DSC Microcal Corp, avec des cuves de 1.22 ml. Afin d'assurer l'indépendance des mesures de la vitesse de chauffe, cette dernière a été fixée, à 1 mn^{-1} . La vitesse de chauffage a été choisie en fonction du fait qu'elle a une importance fondamentale sur l'intensité du signal et pour s'affranchir des phénomènes d'agrégation et des effets liés à la cinétique de dépliement. Elle permet de minimiser les gradients thermiques au sein de l'échantillon et de la référence, et de travailler dans des conditions très voisines de l'équilibre thermodynamique car les protéines globulaire se dénaturent complètement en moins de 10 s (Privalov, 1986). Nous avons vérifié que la cinétique de dépliement de la NCS était indépendante de la vitesse de chauffe en enregistrant des thermogrammes à 0.5 mn^{-1} et 1 mn^{-1} .

Bien que la solution de protéine et le tampon servant de référence aient été préalablement dégazés, une pression de 2 bar est appliquée sur les échantillons pour éviter tout dégazage ultérieur accidentel lors des mesures après équilibrage du microcalorimètre.

Les thermogrammes ont été enregistrés entre 15°C et 90°C . L'intervalle en température a été choisi en fonction du temps de réponse de l'appareil et pour mesurer la chaleur spécifique de la forme dénaturée.

2.2.3.2 Conditions expérimentales

Les expériences de calorimétrie ont été faites en tampon phosphate 60 mM sur divers échantillons de NCS native ou dénaturée à la concentration de 1 mg cm^{-3} . La protéine native a

été solubilisée dans H₂O à pH 5,0, 5,5, 6,5 et 7,0 et dans D₂O à pH 7,0. La protéine dénaturée chimiquement a été étudiée dans H₂O à des concentrations de 1, 2 et 3 M de GdnHCl et dans D₂O à 2, 3 et 5 M. Certaines mesures ont été effectuées à des concentrations de protéine comprises entre 0,5 et 5 mg cm⁻³ afin de vérifier que les résultats obtenus sont indépendants de la concentration. Enfin le taux de réversibilité du processus de dépliement a été contrôlé en effectuant plusieurs balayages, sur le même échantillon préparé à des valeurs de pH différentes.

2.2.3.3 Traitement des données expérimentales

Un thermogramme du tampon utilisé a été enregistré et soustrait de celui de la solution de protéine. La plupart des résultats présentés ici ont été obtenus après soustraction d'une ligne de base cubique décrivant à la fois le comportement en température de la chaleur spécifique de l'état natif et celui de l'état dénaturé. Le thermogramme résultant ne représente donc plus que l'excès de capacité calorifique, $\langle \Delta C_P(T) \rangle$, correspondant à la chaleur latente de transition.

Les courbes ont été analysés, en fonction de la température par la relation :

$$\langle \Delta C_P(T) \rangle = \frac{K_D(T) \langle \Delta H_v \rangle \langle \Delta H \rangle}{[1 + K_D(T)]^2 RT^2} \quad (2.2)$$

où K_D , $\langle \Delta H \rangle$ et $\langle \Delta H_v \rangle$ sont définis par les expressions (1.1), (1.11) et (1.14), respectivement.

2.2.4 Diffusion des rayons X aux petits angles

2.4.1 Appareillage

Les expériences de diffusion des rayons X aux petits angles ont été effectuées sur la ligne de lumière D24 de l'anneau de stockage DCI de LURE (Laboratoire pour l'Utilisation de Rayonnement Electromagnétique, Orsay), en utilisant le rayonnement synchrotron.

Le schéma du spectromètre D24 est représenté sur la Fig. 2.2

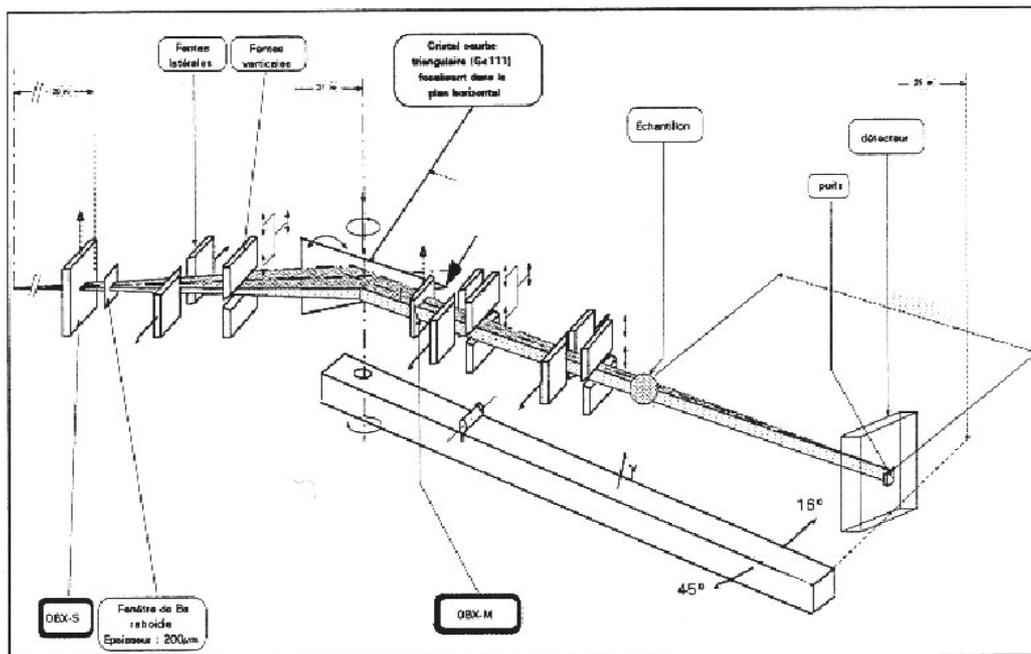


Fig 2. 2 Le schéma du spectromètre D24

La longueur d'onde λ est sélectionnée grâce à un monochromateur constitué d'un cristal de Germanium (111) et ajustée à 1.488 Å (énergie correspondante : 8.3 keV) en se plaçant sur le seuil d'absorption du Nickel. La focalisation du faisceau est assurée en courbant le monochromateur. Plusieurs jeux de fentes permettent de limiter les dimensions du faisceau (environ $3 \times 0.5 \text{ mm}^2$ au niveau de l'échantillon), et de supprimer les diffusions parasites. La collection de l'intensité diffusée se fait à l'aide d'un détecteur linéaire à gaz rempli d'un mélange de 90% de Xénon et 10% de CO_2 . Dans nos expériences, le détecteur était placé à 1.32 m de l'échantillon, ce qui a permis d'explorer le domaine en Q : $0.015 \text{ \AA}^{-1} < Q < 0.27 \text{ \AA}^{-1}$.

La cellule de mesure est un capillaire en quartz de 1.5 mm de diamètre. Le capillaire est placé dans un environnement sous vide, afin de diminuer l'absorption par l'air. La température à l'intérieur de la cellule est régulée par un bain thermostaté. Un pousse-seringue automatique a été mis en place pour changer continûment la solution de protéine exposée au faisceau. Ceci permet d'éviter la formation de radicaux libres et les phénomènes d'agrégation qui en résultent. Le déplacement de l'échantillon dans la cellule de mesure a été ajusté de telle manière que les protéines soient exposées au faisceau de rayons X moins de 2 minutes. Il a été vérifié au préalable que les premiers événements dus à l'irradiation apparaissent dans une

solution de NCS après 600 secondes d'exposition à température ambiante, et après 400 secondes à 75 °C.

2.4.2 Conditions expérimentales

Les expériences de diffusion des rayons X aux petits angles ont été réalisées en fonction de la température en utilisant un tampon à base d'eau légère. La concentration de la NCS était de 5 mg cm^{-3} et la température comprise entre 20°C et 80°C. Avant de commencer les mesures de diffusion, nous avons attendu 10 mn, après chaque changement de température, pour que la solution de protéine atteigne son équilibre thermique. Le spectre de diffusion des tampons n'a pas été mesuré à toutes les températures. Les spectres aux températures manquantes ont été interpolés à partir des mesures effectivement réalisées. La solution mère de NCS a été dégazée avant l'expérience afin d'éviter la formation de bulles aux températures les plus hautes.

Au cours des premières expériences des rayons X aux petits angles, nous avons déterminé la concentration de tampon qui possède une force ionique permettant de réduire suffisamment les interactions répulsives entre les molécules de NCS native. Ceci est indispensable pour obtenir une intensité diffusée qui ne soit pas affectée par les interactions intermoléculaires. Par contre, trop réduire les interactions électrostatiques peut entraîner l'agrégation des molécules. Cette étude a été faite avec du tampon phosphate concentré à 10 mM, 20 mM, 50mM, 60 mM et 100 mM. A 10 mM et 20 mM les interactions répulsives sont très fortes. Par contre elles disparaissent à partir de 50 mM. Nous avons donc décidé de solubiliser la protéine dans du tampon phosphate à 60 mM, pH7.

La transmission de chaque solution a été mesurée en plaçant entre l'échantillon et le détecteur un barreau de noir de carbone, qui a la particularité de présenter une forte diffusion presque isotrope. L'intégrale de l'intensité diffusée par le noir de carbone dans un domaine angulaire donné est directement proportionnelle à l'intensité transmise par l'échantillon

2.4.3 Traitement des données expérimentales

Toutes les courbes de diffusion ont été normalisées par la réponse du détecteur et par la transmission. A chaque température, le spectre du tampon est soustrait de celui de la

solution de protéine. Ceci permet de s'affranchir du bruit de fond provenant d'une part des diffusions parasites dues à la cellule de mesure, aux fentes et fenêtres, etc., et d'autre part des fluctuations de densité du tampon.

Un commentaire s'impose sur cette soustraction du bruit de fond. La détermination de l'intensité diffusée $I(Q)$ est importante dans le domaine des petits Q , où elle permet l'obtention du rayon de giration R_g , mais aussi dans la région des grands Q , où elle permet d'obtenir des informations sur la nature de (ou des) états dénaturés. La valeur de $I(Q)$ dans cette région étant très faible, il est absolument indispensable que la correction du bruit de fond soit parfaite. Afin de vérifier que nous avons effectué correctement cette correction, nous avons utilisé la loi de Porod (1951) qui dit que pour, un objet de surface bien définie, l'intensité diffusée $I(Q)$ se comporte en $1/Q^4$ dans la région des grands Q . Cette loi s'applique pour une protéine globulaire (ou plus exactement compacte) dans le domaine en Q : $1/R_g \ll 1/Q \ll 1/a$, à condition que les fluctuations de densité électronique à l'intérieur de la protéine ne soient pas trop importantes. a est une distance caractéristique de la structure interne de la protéine. On peut prendre a de l'ordre de grandeur de la taille d'un résidu, c'est-à-dire de l'ordre de 4 Å. Nous avons d'abord vérifié que la NCS est une protéine qui suit la loi de Porod, en calculant à l'aide du programme CRY SOL (Svergun et al., 1995) l'intensité diffusée théorique $I_{th}(Q)$ à partir des coordonnées cristallographiques données dans la PDB (référence 1NOA). Il apparaît que $I_{th}(Q)$ suit une loi en $1/Q^4$ dans le domaine en Q : $0.18 \text{ \AA}^{-1} < Q < 0.25 \text{ \AA}^{-1}$. Nous avons ensuite vérifié que, dans le domaine en température où la protéine reste compacte ($22 \text{ }^\circ\text{C} < T < 62 \text{ }^\circ\text{C}$), l'intensité diffusée mesurée $I(Q)$, obtenue après correction du bruit de fond, suit bien dans cette région en Q , le comportement en $1/Q^4$. Nous en déduisons que notre correction du bruit de fond est parfaitement correcte pour ces températures, et nous admettons qu'il en est de même pour les températures plus élevées.

Les spectres ainsi traités peuvent alors servir à l'analyse des données.

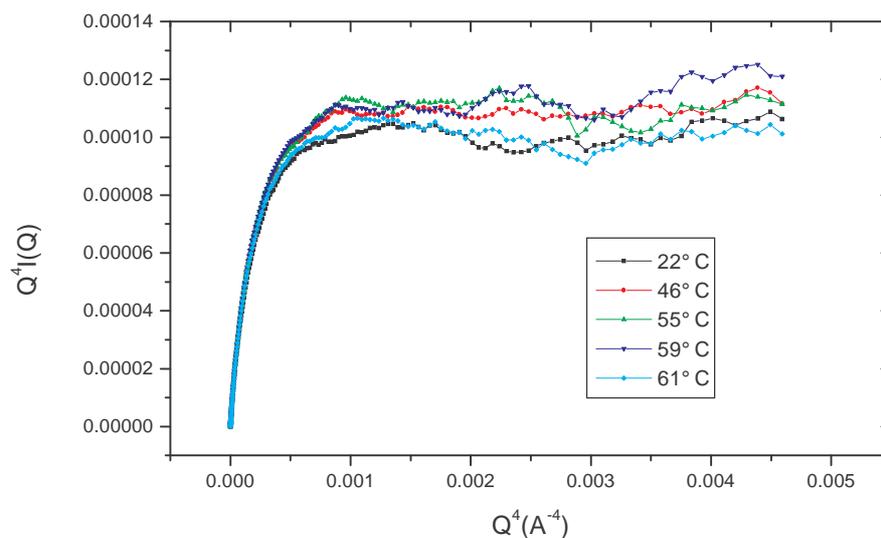


Fig 2. 3 Représentation de Porod des spectres de diffusion de la NCS à différentes températures. Dans un souci de clarté, les courbes ont été lissées afin de s'affranchir du bruit expérimental. La procédure de lissage consiste, pour chaque valeur de Q , à faire une moyenne des intensités sur 10 points expérimentaux. Il a été soigneusement vérifié que ce lissage a pour unique conséquence de supprimer le bruit.

2.5 Diffusion de neutrons aux petits angles

2.5.1 Appareillage

Les expériences de diffusion des neutrons aux petits angles (DNPA) ont été réalisées au Laboratoire Léon Brillouin à l'aide du spectromètre PACE (Fig.2.2). L'intensité des neutrons diffusés est enregistrée par 30 détecteurs annulaires concentriques entourant un détecteur central servant à les centrer par rapport au faisceau incident et à mesurer l'intensité du faisceau transmis par l'échantillon. Deux configurations de l'appareil correspondant à deux résolutions différentes ($R=2\pi/Q_{\max}$), ont été employées pour déterminer la structure de la protéine native et dénaturée. Pour la première configuration, la longueur d'onde, λ , des neutrons incidents valait 8 Å, les diamètres des diaphragmes définissant la divergence du faisceau incident étaient $\Phi_1 = 7$ mm et $\Phi_2 = 10$ mm et la distance entre l'échantillon et le détecteur, D , était de 2.4 m. Dans ces conditions, les valeurs du transfert de vecteur d'onde, Q , sont comprises entre $9,5 \cdot 10^{-3}$ et $0,1 \text{ Å}^{-1}$. Pour la seconde configuration, $\lambda = 4 \text{ Å}$, $\Phi_1 = 7$ mm, $\Phi_2 = 16$ mm et $D = 1,3$ m. Les valeurs de Q sont alors comprises entre $4 \cdot 10^{-2}$ et $0,4 \text{ Å}^{-1}$.

La résolution $\Delta\lambda/\lambda$ est de l'ordre du 10%.

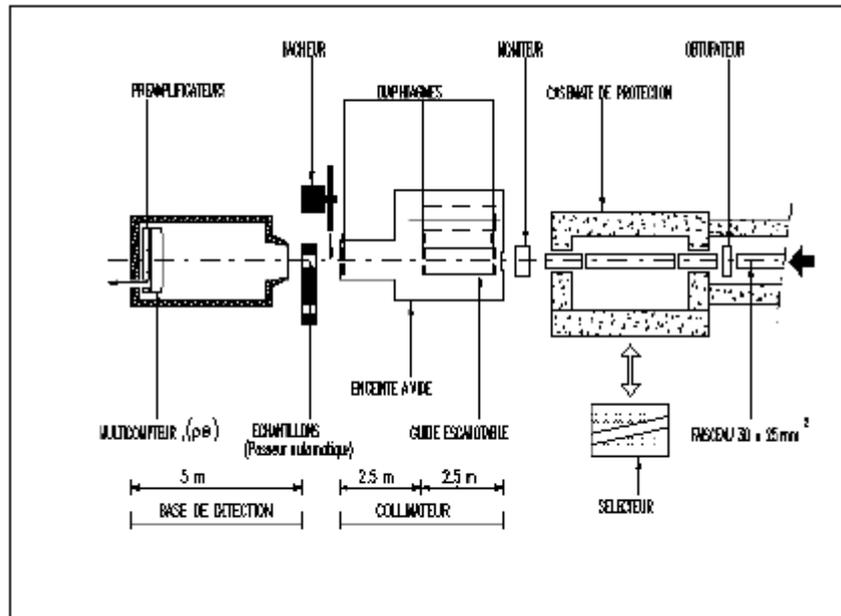


Fig 2. 4 Schéma du spectromètre de diffusion PACE. Le faisceau incident est focalisé par deux diaphragmes espacé de 2.5 m, et de diamètres Φ_1 et Φ_2 . A la sortie du collimateur, le faisceau est diffusé par l'échantillon, puis traverse un tube à vide, avant d'arriver au détecteur. Ce détecteur est relié à un ordinateur qui comptabilise le nombre de neutrons détectés pour chaque angle de diffusion correspondant à chaque anneau.

Dans chaque configuration de l'appareil, nous avons mesuré successivement les spectres de diffusion de la solution de protéine et du tampon correspondant, de l'eau légère contenue dans une cuve de 1mm de trajet optique, et de la cuve vide. Aux plus petites valeurs de Q , la durée des mesures est d'environ 6 heures pour les échantillons et leurs tampons. Pour l'eau légère et la cuve vide, 3 heures suffisent amplement. Le bruit de fond ambiant, B'_{Amb} , a été déterminé en mettant un fort absorbant, constitué de cadmium et de carbure de bore, à la place de l'échantillon. L'intensité du faisceau transmis par chaque échantillon, I_{Ech} , a été déterminée avant et après la mesure de son spectre de diffusion. Afin de ne pas saturer le détecteur central, le faisceau incident était atténué par des plaques de Plexiglas placées avant le collimateur. Chaque comptage a duré environ cinq minutes. Par rapport à la cuve vide, la transmission d'un échantillon est :

$$T_{Ech} = I_{Ech} / I_{CV} \quad (2. 3)$$

2.5.2 Conditions expérimentales

Toutes les solutions de protéine et les tampons correspondants sont contenues dans des cuves en quartz de 5 mm de trajet optique. La température à l'intérieur de la cellule est régulée par un bain thermostaté.

La préparation des échantillons en milieu deutéré a été amplement décrite dans le paragraphe 2.1. L'étude de la variation de la taille de la protéine en fonction de la concentration de GdnHCl a été réalisée avec des solutions de protéines concentrées à 5 mg cm⁻³. La détermination du second coefficient du viriel, A₂, a été faite à des concentrations comprises entre 5 et 20 mg cm⁻³. Enfin le facteur de structure de la NCS dépliée par le GdnHCl a été mesuré à des concentrations de 5 et 20 mg cm⁻³. Toutes ces mesures ont été réalisées à 15°C, avec les concentrations de dénaturant comprises entre 0 et 5 M. Le facteur de structure de la NCS dépliée par la chaleur n'a seulement été déterminé qu'à 78°C, à des concentrations de 5 et 20 mg cm⁻³.

2.5.3 Traitement des données expérimentales

Expression de l'intensité diffusée

L'intensité brute diffusée par un échantillon quelconque, composé de sa cuve et de son contenu, peut s'écrire :

$$I'_{\text{Cont+CV}}(\lambda, Q) = I_0(\lambda) S \Delta\Omega C(\lambda) T_{\text{Cont+CV}}(\lambda) \times \\ \times [e_{\text{CV}} \times I_{\text{CV}}(\lambda, Q) + e_{\text{Cont}} I_{\text{Cont}}(\lambda, Q) + B'(Q)] + B'_{\text{Amb}}$$

(2. 4)

où S est la section du faisceau incident d'intensité I_0 . $\Delta\Omega$ est l'angle solide de collection du détecteur et $C(\lambda)$ son rendement pour des neutrons de longueur d'onde λ . e_{CV} est l'épaisseur

des parois de la cuve et e_{Cont} son trajet optique interne, c'est-à-dire l'épaisseur de son contenu. $I_{\text{CV}}(\lambda, Q)$ et $I_{\text{Cont}}(\lambda, Q)$ sont les sections efficaces de diffusion, par unité de volume et d'angle solide, de la cuve vide et de son contenu. $B'(Q)$ est un bruit de fond provenant des 'ailes' du faisceau direct dues à une collimation imparfaite et à la diffusion par l'air au voisinage de l'échantillon. B'_{amb} est le bruit de fond ambiant. De la même manière, l'intensité diffusée par la cuve vide est :

$$I'_{\text{CV}}(\lambda, Q) = I_0(\lambda) S \Delta \Omega C(\lambda) T_{\text{CV}}(\lambda) [e_{\text{CV}} I_{\text{CV}}(\lambda, Q) + B'(Q)] + B'_{\text{Amb}} \quad (2.5)$$

Il en résulte que la quantité

$$\begin{aligned} I'_{\text{Cont}}(\lambda, Q) &= \frac{I'_{\text{Cont+CV}}(\lambda, Q) - B'_{\text{Amb}}}{T_{\text{Cont+CV}}(\lambda)} - \frac{I'_{\text{CV}}(\lambda, Q) - B'_{\text{Amb}}}{T_{\text{CV}}(\lambda)} \\ &= I_0(\lambda) S \Delta \Omega C(\lambda) e_{\text{Cont}} I_{\text{Cont}}(\lambda, Q) \end{aligned} \quad (2.6)$$

est indépendante des bruits de fond et représente la seule diffusion du contenu de la cuve, corrigée par la transmission.

Les spectres de l'eau et de la cuve vide permettent de corriger les spectres des échantillons des variations de la réponse des divers détecteurs. En effet, aux petites valeurs de Q , l'intensité diffusée par l'eau légère

$$\begin{aligned} I'_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda, Q) &= \frac{I'_{\text{H}_2\text{O+CV}}(\lambda, Q) - B'_{\text{Amb}}}{T_{\text{H}_2\text{O+CV}}(\lambda)} - \frac{I'_{\text{CV}}(\lambda, Q) - B'_{\text{Amb}}}{T_{\text{CV}}(\lambda)} \\ &= I_0(\lambda) S \Delta \Omega C(\lambda) e_{\text{H}_2\text{O}} I_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda, Q) \end{aligned} \quad (2.7)$$

est principalement d'origine incohérente et donc indépendante de Q . En général l'épaisseur de cet échantillon d'eau légère est fixé à 1 mm afin d'avoir une transmission de l'ordre de 0,5.

La section efficace de l'eau légère $I_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda, Q)$ est mesurable, comme nous le verrons dans la suite. Dans ces conditions, les équations (2.6) et (2.7) conduisent à la détermination de la

grandeur qui nous intéresse $I_{\text{cont}}(\lambda, Q)$, à partir des mesures de $I'_{\text{cont+Cv}}(\lambda, Q)$, $I'(\lambda, Q)$ et $I'_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda, Q)$

Traitement des spectres bruts

Les données expérimentales sont traitées selon la procédure habituelle, suggérée par les considérations précédentes et décrite par J.-P. Cotton [1991], en utilisant le programme PASIDUR écrit par D. Lairez du Laboratoire Léon Brillouin. Pour chaque valeur de Q ce programme calcule la quantité suivante :

$$I_{\text{Prot}}(\lambda, Q) = \frac{I'_{\text{Sol}}(\lambda, Q) - I'_{\text{Tamp}}(\lambda, Q)}{I'_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda, Q)} \frac{1}{V} \left. \frac{d\sigma_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda)}{d\Omega} \right|_{\text{Mes}} \quad (2.8)$$

qui représente la section efficace de diffusion par unité de volume et d'angle solide, de la protéine seule ;

$I'_{\text{Sol}}(\lambda, Q)$ et $I'_{\text{Tamp}}(\lambda, Q)$ sont donnés par l'expression (2.6) pour la solution de protéine et son tampon, respectivement. $V^{-1} \left. \frac{d\sigma_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda)}{d\Omega} \right|_{\text{Mes}} = I_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda, Q)$ est la section efficace de diffusion de l'unité de volume de l'échantillon d'eau légère mesuré avec des neutrons de longueur d'onde λ .

Calibration absolue

Pour obtenir la valeur absolue de la section efficace de diffusion incohérente de l'échantillon d'eau légère, le détecteur est déplacé de façon à pouvoir mesurer le faisceau direct avec les mêmes détecteurs que ceux employés lors des mesures des intensités diffusées. Pour éviter la saturation de ceux-ci, le faisceau direct est préalablement atténué. Le facteur d'atténuation est obtenu en faisant le rapport de l'intensité diffusée par un matériau fortement diffusant, comme le graphite ou le Téflon, en absence et en présence de l'atténuateur. de cette manière nous avons pu estimer la section efficace de diffusion de l'échantillon d'eau légère de 1 mm d'épaisseur à 1.00 cm^{-1} à $\lambda = 5 \text{ \AA}$ et à 1.16 cm^{-1} à $\lambda = 8$. Remarquons que la valeur calculée à partir des longueurs de diffusion atomiques n'est que de $0,43 \text{ cm}^{-1}$. La différence est due à la diffusion multiple et aux effets inélastiques [Calmettes, cours d'Albé].

Bruit de fond incohérent.

Pour obtenir le spectre de diffusion cohérente d'un échantillon il est souvent nécessaire de corriger le résultat donné par l'expression (2.8) de la diffusion incohérente. Lorsqu'une protéine est mise en solution dans un tampon deutérié, un certain nombre N_H des atomes d'hydrogène qu'elle contient ne s'échangent pas contre les atomes de deutérium du milieu et donnent une contribution incohérente. Le bruit incohérent par unité de volume peut se mettre approximativement sous la forme :

$$BI = \frac{\sigma_{inc}^H}{4\pi} \times N_H \times moli \times N_A$$

où N_H est le nombre des hydrogènes non échangés, qui est égal à 577, et *moli* est le nombre de moles par unité de volume, N_A le nombre d'Avogadro. A la concentration de 5 mg/ml la valeur ainsi calculée, du bruit incohérent est égale à $1.23 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$.

Mais pratiquement, même si de grandes précautions ont été prises lors de la préparation des échantillons en milieu deutérié, ils restent sujets à de légères contaminations accidentelles. Ceci a pour conséquence que le bruit incohérent réel est en général supérieur au bruit théorique. Comme nous l'avons déjà vu pour les rayons X, nous avons utilisé la loi de Porod afin d'effectuer une correction correcte du bruit de fond. Systématiquement nous avons remarqué, sur la protéine native, qu'une soustraction du bruit de fond égal à deux fois et demie la valeur théorique est nécessaire pour que la loi de Porod soit satisfaite. La solution mère de protéine étant la même pour tous les échantillons, et ceux-ci étant toujours préparés dans les mêmes conditions, nous admettons que la même correction est valable pour les différentes concentrations en dénaturant.

2.6 Diffusion quasi-élastique de la lumière

Les expériences de diffusion quasi-élastique de lumière ont été réalisées afin de mesurer le coefficient de diffusion de translation et le rayon hydrodynamique de la protéine en fonction du pH. Les expériences de diffusion de la lumière ont été réalisées au Laboratoire Léon Brillouin. La source de lumière est un laser Coherent Radiation à Type du gaz. Un

rayonnement de 647 nm de longueur d'onde a été utilisé car il est peu absorbé par les protéines. Les mesures ont été effectuées à plusieurs angles compris entre 30° et 90° et répétées plusieurs fois pour obtenir une bonne précision statistique.

Les mesures ont été réalisées à la température ambiante dans une plage de pH de valeurs comprises entre 5 et 7, avec un incrément de 0.5. La protéine native concentrée à 1 mg cm⁻³ a été préalablement centrifugée pendant une heure à 45000 g afin d'éliminer les poussières et les micelles de tensioactifs probablement dues au boudin de dialyse utilisé lors des changements de pH de la solution.

Pour obtenir le coefficient de diffusion de la protéine, une somme de deux fonctions exponentielles du temps t , ont été utilisées pour décrire les spectres de diffusion quasi élastique

$$I(Q, t) = \sum_{i=1}^2 A_i \exp(-D_i Q^2 t) \quad (2.9)$$

où A_i et D_i sont, respectivement, les amplitudes et les coefficients de diffusion des deux espèces différentes présentes dans la solution : les molécules de NCS et les micelles. Comme les coefficients de diffusion de ces deux espèces diffèrent d'environ trois ordres de grandeur, leurs valeurs ont pu être obtenues sans ambiguïté.